动 物 学 研 究 2011, Aug. 32(4): 363−370 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.04363

钱塘江日本沼虾野生群体遗传变异的 SSR 分析

马克异 [1], 冯建彬 [1], 谢 楠 [2], 冯晓宇 [2], 李家乐 [1,*]

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 浙江省杭州市农业科学研究院水产研究所，浙江 杭州 310024)

摘要：利用微卫星标记分析了钱塘江干流水域闻堰、富阳、场口、桐庐等 7 个野生日本沼虾群体的遗传多样性和遗传结构。结果表明：10 个微卫星位点呈现高度多态性; 闻堰、富阳、场口、新安江等中下游野生群体的遗传多样性水平有高于歙县和休宁两个上游群体遗传多样性水平的趋势。符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验的结果表明, 钱塘江日本沼虾群体近期没有发生瓶颈效应, 群体数量也没有下降。F_{ST} 的范围介于 0.0201 ~ 0.1069。分子方差分析结果显示, 大部分的遗传变异(93.48%)存在于个体间, 少部分遗传变异(6.52%)存在于群体之间。群体间 F_{ST} 及 AMOVA 分析表明, 群体处于中等遗传分化水平; 基于 D_A 遗传距离构建的 NJ 聚类树显示, 地理位置相邻的群体聚在一起。STRUCTURE 分析 413 份参试的日本沼虾样本被分为 2 个理论种群, 即上游歙县和休宁群体为一个理想种群, 其余中下游的 5 个群体为另一个理想种群。日本沼虾的遗传多样性和遗传结构与所生存的地理位置具有相关性。

关键词：钱塘江; 日本沼虾; 微卫星; 遗传多样性; 遗传结构
中图分类号：Q959.223.63; Q343.1; Q311.8; Q16 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)04-0363-08

Microsatellite analysis of genetic variation of the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in Qiantang River

MA Ke-Yi[1], FENG Jian-Bin[1], XIE Nan[2], FENG Xiao-Yu[2], LI Jia-Le[1,*]

(1.*Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources*, *Shanghai Ocean University*, *Ministry of Education, Shanghai* 201306, *China*; 2. *Fishery Research Institute*, *Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou* 310024, *China*)

Abstract: Genetic diversity and genetic structure of 7 wild stocks of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in Qiantang River, i.e. Wen-yan, Fu-yang, Chang-kou, Tong-lu, Xin-an-jiang, She-xian and Xiu-ning, were investigated using 10 microsatellite DNA markers. The result showed that all the 10 loci were highly polymorphic. There was a trend that the level of genetic diversity of wild stocks in downstream and midstream were higher than the upstream ones'. Sign test and Wilcoxon sign rank test results showed that the stocks in Qiantang River had no bottleneck effect, and the number of stocks had not declined recently. F_{ST} among stocks ranged from 0.0201 to 0.1069. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that a higher portion (93.48%) of variations existed within individuals, while lower portion (6.52%) existed among stocks. F_{ST} and AMOVA analysis across all stocks and loci indicated the medium level of divergence among the stocks. The NJ clustering tree based on D_A genetic distance demonstrated that the stocks of adjacent geographical position clustered together. 413 individuals obtained from six wild stocks could be divided into two potential populations based on the genetic structure. This study demonstrated that genetic diversity and genetic structure of *M. nipponense* stocks were relevant to geographical position where they survived.

Key words: Qiantang River; *Macrobrachium nipponense*; Microsatellite; Genetic diversity; Genetic structure

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)俗称青虾、河虾, 是我国重要的淡水经济养殖虾类(Li et al, 2005; Feng et al, 2008), 广泛分布于我国淡水水域, 也常出现在低盐度河口区。钱塘江流域是日本沼虾

收稿日期：2010-11-08；接受日期：2011-05-24
基金项目：国家自然科学基金项目(31001111); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金项目(SSC08004); 浙江省杭州市科技局种子种苗项目(20071032H27); 上海海洋大学博士科研启动基金项目(B-8201-08-0279)
*通讯作者(Corresponding author)，Tel: 021-61900401, E-mail: jlli2009@126.com
第一作者简介：马克异, 男, 硕士研究生, E-mail: mky850125@163.com

野生资源主要分布区和重要产区之一; 但从 20 世纪 50 年代末以来, 随着新安江电站和富春江电站的相继建成并截流, 大大改变了日本沼虾的野生生活环境, 加之野生资源的过度采捕, 使得钱塘江流域野生日本沼虾资源量锐减, 同时由于生产中不注重良种选育, 从而出现了种质退化现象。因此, 钱塘江流域日本沼虾的种质资源鉴定和评估, 对于保护该虾野生资源以及促进钱塘江流域淡水养虾业的可持续发展具有重要的现实意义。

微卫星标记具有多态性高、共显性等优点, 已广泛应用于虾类群体遗传学、种质鉴定及 QTL 定位等研究领域(Brooker et al, 2000; Kancee et al, 2007; Chand et al, 2005)。目前, 日本沼虾的相关研究主要包括: 采用线粒体 COI (Yang et al, 2007; Feng et al, 2008)和 16S Rrna (Sun et al, 2007)序列片段变异, 分析了我国五大淡水湖泊、长江、澜沧江野生群体的遗传多样性和系统进化。RAPD(Jiang et al, 2006; Wu et al, 2008; Zhu et al, 2008)方法分析了长江、龙感湖、高邮湖等水域野生群体的遗传多样性, 以及微卫星标记对洪泽湖(Feng et al, 2010)、太湖(Feng et al, 2010)、长江中下游(Fu et al, 2010)群体进行遗传多样性分析。本研究通过微卫星变异方法分析了钱塘江干流水域日本沼虾野生群体的遗传多样性, 探讨钱塘江干流水域日本沼虾群体遗传结构及群体数量变化, 以期为钱塘江流域日本沼虾种质资源保护和合理挖掘利用以及良种选育提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 样本采集及 DNA 提取

2009 年 10 月在钱塘江上、中、下游水域采集了 7 个日本沼虾野生群体, 具体采集点见表 1 和图 1。

表 1 日本沼虾样本采集信息

Tab. 1 Details of *Macrobrachium nipponense* samples in this study

群体编号 Stock code	群体 Stock	采集地点 Sample site	采集时间 Sample date	样本量 Sample size
1	闻堰 WY	萧山区闻堰镇	2009.10	59
2	富阳 FY	富阳市灵桥镇	2009.10	59
3	场口 CK	富阳市场口镇	2009.10	59
4	桐庐 TL	桐庐县桐君街道	2009.10	59
5	新安江 XAJ	建德市新安江镇	2009.10	59
6	歙县 SX	歙县郑村镇	2009.10	59
7	休宁 XN	休宁县阳湖镇	2009.10	59

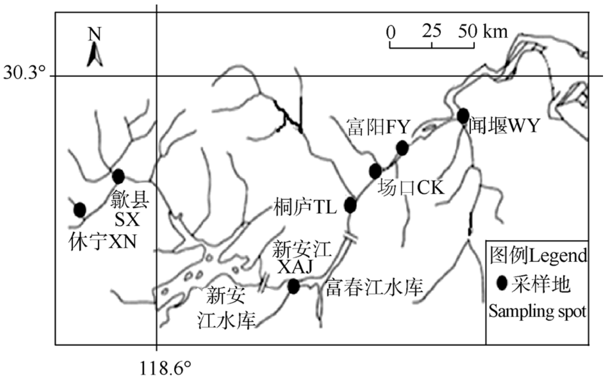

图 1 钱塘江 7 个日本沼虾群体的采样位点

Fig. 1 Seven sample sites of *Macrobrachium nipponense* stock in Qiantang River

每个群体选取 59 尾, 整个虾体用无水乙醇固定。苯酚-氯仿法(Sambrook & Russell, 2001)提取日本沼虾腹部肌肉组织基因组 DNA, 用灭菌的双蒸水溶解后测定浓度和纯度, −20 ℃保存备用。

1.2 微卫星反应

日本沼虾的 10 对微卫星引物为自行开发(表 2)。PCR 反应采取改良后的 Semi-touchdown PCR 方法, 以减少非特异性条带产生, 反应条件为: (1) 94 ℃ 3 min; (2) 94 ℃ 30 s; (3)(T_m+4)30 s, 递降 1 ℃至 T_m; (4)72 ℃ 30 s; (T_m+4)至(T_m+1)各 4 个循环, T_m 时 30 个循环; (5) 72 ℃ 3 min; (6) 4 ℃保存。产物经 1.5%琼脂糖电泳初检合格后, 采用 QIAxcel 全自动毛细管核酸分析系统 QIAxcel DNA High Resolution Kit(1200)凝胶卡夹进行基因分型, 以 pUC18 DNA/*Msp*I 为标准相对分子质量。

1.3 数据分析

根据条带位置确定基因型, 利用 GENEPOP 4.0(Rousset, 2008)进行群体遗传分析, 计算等位基因数(number of allele, A)、有效等位基因数(effective number of allele, N_e)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、香农多样性指数(Shannon’s information index, I)和基因流(Gene flow, N_m)。用公式计算微卫星位点多态信息含量(polymorphism information content, *PIC*) (Botstein et al, 1980)。

利用 ARLEQUIN 3.1(Excoffier et al, 2005)计算群体遗传分化的 F-统计量(F-statistics, F_{ST})及方差分析(AMOVA)。利用 DISPAN 计算群体间 Nei’s 遗传距离(Genetic distance, D_A)(Nei et al, 1983), 基于 D_A 构建 NJ 系统树, 并进行 Bootstrap 检验。

表 2　日本沼虾微卫星引物序列

Tab. 2　Sequences of SSR primers of *Macrobrachium nipponense*

位点 Locus	引物序列 Primer (5'-3')	重复单元 Repeat motif	序列号 GenBank Accession No.
*Mni*30	F:TGCTGTTATCGTTGGCTGAG R:ACCCGTGTGTGTGAACTGAG	$(AC)_{11}$	GQ257527
*Mni*34	F:TGCAGAGAGTGGAGTGATGAA R:TCACCCCATCAACCTAAAGC	$(AC)_{11}$	GQ257531
*Mni*45	F:AGTATGCTTGCTTACCTCA R:CATGAACGACACTTTTCG	$(TG)_{14}$	GQ257542
*Mni*52	F:CTCGTTCTTGCCACTCTT R:TGACCCGTCTATGTTCGT	$(TG)_{22}…(GA)_{27}$	GQ257549
*Mni*56	F:TATTGGCGCAGCACCTAA R:TCATCGGCTTCAACAGAG	$(CA)_{13}…(CA)_{5}$	GQ257553
*Mni*76	F:GTTCTCAGCCTTCTCCAT R:GTTTATCGCTTTATTAGTCC	$(AG)_{10}…(AG)_{11}$	GQ257573
*Mni*82	F:AACAAAGGTGAAATGCCACA R:CCGCCAAATCAACAGTAATC	$(GT)_{7}…(TG)_{23}$	GQ257579
*Mni*86	F:TACTAACACCGAAGCTATGC R:AACAGTCACAACCGAACC	$(AC)_{11}…(AC)_{5}$	GQ257583
*Mni*93	F:TCACAGCACGAGATAACA R:TGCCGATTCTGGACTTTA	$(TG)_{4}…(TG)_{15}$	GQ257590
*Mni*102	F:ACCTCGGGAATATCTCATC R:CAGTGGCATCGTGTCAGC	$(GT)_{17}$	GQ257599

F：正向引物(Forward primer); R：反向引物(Reverse primer)。

根据各位点等位基因频率, 基于无限等位基因模型(infinite allele model, IAM)、逐步突变模型(step-wise mutation model, SMM)和双相突变模型(two-phased mutation model, TPM), 利用BOTTLENECK 3.4 (Maruyama & Fuerst, 1985)计算平均期望杂合度(expected average heterozygosity, H_{EQ}), 重复为 1 000 个, 并通过符号检验(Sign test)和 Wilcoxon 符号秩次检验(Wilcoxon sign rank test)分析杂合过剩是否显著, 以通过分析群体突变-漂移平衡来估计日本沼虾群体数量动态变化。

利用 STRUCTURE2.3(Evanno et al, 2005)进行群体遗传结构分析, 计算每个 K 值对应的“Var[ln $P(D)$]”均值, 然后选择最佳 K 值, 即为群体遗传结构的理论群体数。

2　结果与分析

2.1　微卫星位点的遗传变异和群体的遗传多样性

本研究所用的 10 对微卫星引物在 7 个群体中均得到了较好的扩增。各位点等位基因数及多态信息含量如表 3 所示。10 个微卫星位点的 *PIC* 介于

表 3　日本沼虾 10 个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量

Tab. 3　Statistics of number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for 10 microsatellite loci of *Macrobrachium nipponense*

位点 Locus	等位基因数 Number of alleles, A	有效等位基因数 Number of effective alleles, N_e	观测杂合度 Observed heterozygosity, H_o	期望杂合度 Expected heterozygosity, H_e	多态信息含量 Polymorphism information content(PIC)
*Mni*30	30	8.88	0.68	0.80	0.85
*Mni*34	15	10.63	0.47	0.91	0.78
*Mni*45	12	9.48	0.60	0.90	0.80
*Mni*52	28	14.27	0.70	0.93	0.89
*Mni*56	19	10.47	0.54	0.91	0.87
*Mni*76	29	20.32	0.70	0.95	0.91
*Mni*82	29	20.20	0.76	0.95	0.92
*Mni*86	11	6.46	0.64	0.85	0.79
*Mni*93	19	8.62	0.68	0.89	0.84
*Mni*102	19	5.91	0.41	0.83	0.66
平均值 Mean	21	11.52	0.62	0.90	0.83

0.66～0.92 之间，根据 Botstein 等提出的标准，均属于高度多态性位点(*PIC*>0.5)。有效等位基因数 N_e 介于 5.91～20.32 之间，与 *PIC* 的顺序基本一致。

日本沼虾 7 个野生群体的多样性分析见表 4。7 个群体 Shannon 多样性指数变化范围为 2.15～2.37，由高到低依次为：闻堰>新安江>富阳=场口>歙县>休宁>桐庐；期望杂合度变化范围为 0.83～0.88，由高到低依次为：闻堰>新安江>富阳=场口>歙县>休宁=桐庐；有效等位基因数变化范围为 6.86～9.24，由高到低依次为：闻堰>场口>新安江>富阳>歙县>休宁>桐庐。总之，除桐庐群体外，钱塘江中下游水域日本沼虾群体的遗传多样性指数普遍高于上游。

2.2 瓶颈效应分析

瓶颈效应分析微卫星位点变异情况的结果显示(表 5)，在 IAM 突变模型下，钱塘江日本沼虾群体的所有位点 H_E 均高于 H_{EQ}；在 TPM 突变模型下，除 *Mni*30 和 *Mni*102 位点外，其它位点的 H_E 均高于 H_{EQ}，其中 *Mni*34、*Mni*45、*Mni*76 和 *Mni*82 位点差异极显著；在 SMM 突变模型下，*Mni*34、*Mni*45、*Mni*76、*Mni*82 和 *Mni*86 位点 H_E 高于 H_{EQ}，其余位点 H_E 低于 H_{EQ}，其中 *Mni*45 位点差异显著，*Mni*30 和 *Mni*102 位点差异极显著。

符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验的结果显示(表 6)，在 IAM 突变模型下，闻堰群体显著或极显著偏离突变-漂移平衡，表现出显著或极显著的杂合过剩；但在 TPM 突变模型下，两种检验均显示 7 个群体没有显著或极显著偏离突变-漂移平衡；而在 SMM 突变模型下，两种检验显示出钱塘江半数群体极显著偏离突变-漂移平衡，表现出极显著的杂合过剩。

2.3 群体遗传分化

基于等位基因频率计算出各群体间的日本沼虾 Nei's 遗传距离如表 7 所示，场口和歙县群体间遗传距离最远(D_A=0.3270)，闻堰和富阳群体间遗传距离最近(D_A=0.1334)；7 个日本沼虾野生群体在 10 个微卫星位点上平均的配对 F_{ST} 介于 0.0201 ~ 0.1069，接近中等程度分化($0.05<F_{ST}<0.15$)的水平(Hartl & Clark，1997)，其中闻堰和场口 *F*-统计量最小(F_{ST} = 0.0201)，桐庐和歙县之间最大(F_{ST} = 0.1069)。AMOVA 结果显示(表 8)，群体间遗传

表 4 日本沼虾群体的遗传多样性

Tab. 4 Summary statistics analysis of genetic diversity in *Macrobrachium niponense* stocks

参数 Parameter	闻堰 WY	富阳 FY	场口 CK	桐庐 TL	新安江 XAJ	歙县 SX	休宁 XN	平均值 Mean
N_e	9.24	7.64	8.63	6.86	8.50	7.35	7.03	7.89
H_o	0.61	0.59	0.64	0.62	0.66	0.60	0.56	0.61
H_e	0.88	0.85	0.85	0.83	0.86	0.84	0.83	0.85
I	2.37	2.25	2.25	2.15	2.30	2.20	2.19	2.24

表 5 日本沼虾群体微卫星位点瓶颈效应分析

Tab. 5 Bottleneck test by locus in *Macrobrachium nipponense* stocks

位点 Locus	H_E	无限等位基因模型 Infinite allele model			双相突变模型 Two-phased mutation model			逐步突变模型 Step-wise mutation model		
		H_{EQ}	DH/sd	P	H_{EQ}	DH/sd	P	H_{EQ}	DH/sd	P
*Mni*30	0.888	0.862	0.543	0.343	0.920	-1.788	0.065	0.943	-3.517	0.009**
*Mni*34	0.907	0.718	1.713	0.000**	0.825	1.796	0.000**	0.884	0.955	0.136
*Mni*45	0.896	0.663	1.817	0.000**	0.778	1.786	0.000**	0.853	1.400	0.020*
*Mni*52	0.931	0.847	1.469	0.002**	0.913	0.882	0.170	0.939	-0.535	0.194
*Mni*56	0.906	0.779	1.603	0.001**	0.865	1.120	0.081	0.908	-0.118	0.370
*Mni*76	0.953	0.880	1.825	0.000**	0.926	1.741	0.000**	0.944	0.641	0.177
*Mni*82	0.952	0.853	1.752	0.000**	0.917	2.050	0.000**	0.940	0.464	0.165
*Mni*86	0.846	0.638	1.513	0.005**	0.755	1.226	0.051	0.839	0.198	0.504
*Mni*93	0.885	0.775	1.231	0.019*	0.863	0.598	0.307	0.909	-0.846	0.089
*Mni*102	0.832	0.778	0.631	0.281	0.866	-0.995	0.151	0.910	-3.424	0.002**

DH/sd: H_E 与 H_{EQ} 的差与标准偏差之比(Ratio of deviation to the standard deviation of H_E and H_{EQ})。

* H_E 与 H_{EQ} 差异显著(Significant difference)($P < 0.05$); ** H_E 与 H_{EQ} 差异极显著(Extremely significant difference)($P <0.01$)。

表 6 日本沼虾群体突变-漂移平衡分析

Tab. 6 Departures from mutation-drift equilibrium in *Macrobrachium nipponense* stocks

群体 Stock	符号检验 Sign test						Wilcoxon 符号秩次检验 Wilcoxon sign-rank		
	IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
	H_E/H_D	P	H_E/H_D	P	H_E/H_D	P	P	P	P
闻堰 WY	9/1	0.050*	8/2	0.162	4/6	0.183	0.003**	0.232	0.160
富阳 FY	8/2	0.175	6/4	0.617	1/9	0.002**	0.131	0.922	0.002**
场口 CK	8/1	0.079	5/4	0.517	4/5	0.285	0.129	0.570	0.203
桐庐 TL	6/3	0.488	5/4	0.530	2/7	0.028*	0.652	0.820	0.010**
新安江 XAJ	8/2	0.181	6/4	0.611	3/7	0.061	0.105	0.846	0.131
歙县 SX	7/3	0.411	6/4	0.616	1/9	0.002**	0.193	0.557	0.003**
休宁 XN	5/4	0.487	4/5	0.286	0/9	0.000**	0.359	0.301	0.002**
合计 Total	10/0	0.007**	8/2	0.015*	5/5	0.360	0.001**	0.105	0.846

H_E/H_D：杂合过剩与不足位点数之比(Ratio of loci number with heterozygosity excess to deficiency)。* 显著偏离平衡(Significant deviation from mutation-drift equilibrium)($P < 0.05$); ** 极显著偏离平衡(Extremely Significant deviation from mutation-drift equilibrium)($P < 0.01$)。IAM：无限等位基因模型(Infinite allele model); TPM：逐步突变模型(Two-phased mutation model); SMM：双相突变模型(Step-wise mutation model)。

表 7 日本沼虾群体间 *F*–统计量(F_{ST}，对角线下)和遗传距离(D_A，对角线上)

Tab. 7 *F*–statistics ($F_{ST,}$ below diagonal)and genetic distance (D_A, above diagonal) among *Macrobrachium nipponense* stocks

群体 Stock	闻堰 WY	富阳 FY	场口 CK	桐庐 TL	新安江 XAJ	歙县 SX	休宁 XN
闻堰 WY		0.1334	0.1409	0.1852	0.1452	0.2930	0.2204
富阳 FY	0.0286		0.1644	0.1701	0.1448	0.2980	0.2607
场口 CK	0.0201	0.0536		0.2388	0.2020	0.3270	0.2881
桐庐 TL	0.0475	0.0386	0.0805		0.2052	0.3265	0.3067
新安江 XAJ	0.0401	0.0276	0.0670	0.0487		0.2535	0.2293
歙县 SX	0.0817	0.0939	0.0972	0.1069	0.0816		0.2508
休宁 XN	0.0606	0.0845	0.0764	0.1023	0.0797	0.0887	

表 8 日本沼虾群体分子方差分析

Tab. 8 AMOVA analysis among *Macrobrachium nipponense* stocks

变异来源 Source of variation	自由度 *df*	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比例(%) Percentage of variance
群体间 Among stocks	6	192.054	0.23459 Va	6.52
群体内个体间 Among individual within stock	406	1756.864	0.96750 Vb	26.92
个体间 Within individuals	413	988	2.39225 Vc	66.56
总变异 Total variation	825	2936.919	3.59434	

变异，占总变异量的 6.52%，亦达到中等遗传分化水平。

基于 D_A 遗传距离，用 NJ 法构建的聚类图结果如图 2 所示，闻堰和场口、富阳和桐庐群体首先分别聚在一起，然后再与新安江群体聚类，最后与歙县和休宁的聚类聚合。

2.4 群体遗传结构

STRUCTURE 运算过程不需要预先了解群体的遗传背景，因而被认为是用于群体遗传结构分析的理想工具(Falush et al, 2003)。经过 10 次重复的

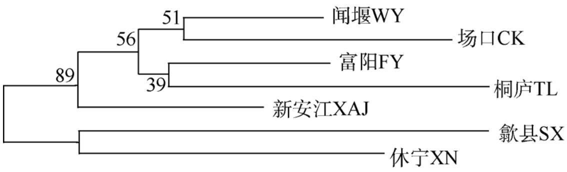

图 2 基于 D_A 遗传距离的 NJ 聚类树
(数字表示 Bootstrap 的置信度)

Fig. 2 NJ clustering tree based on D_A genetic distance
(Number indicate bootstrap confidence values)

1~7 组分群测试，当 K=2 时，出现拐点，我们推断出本实验所用的 413 份参试个体最佳分组应为 2 个理

论种群(图 3)(Evanno et al, 2005)。可以看出，划分的 2 个理论种群与地理位置有一定相关性，划分出的第一个种群包含的个体资源最多，为钱塘江中下游的新安江、桐庐、场口、富阳和闻堰的个体资源；第二个种群则包含上游的休宁和歙县日本沼虾个体资源。

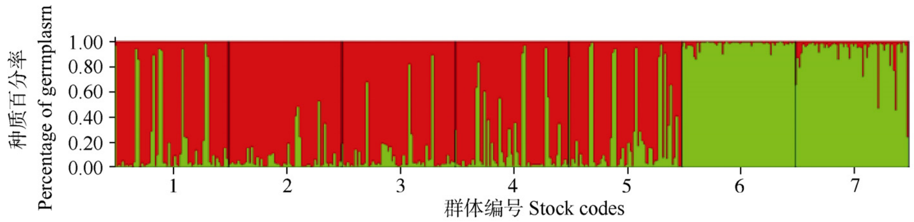

图 3 参试日本沼虾种质资源群体结构分组

Fig. 3 Estimated population structure for *Macrobrachium nipponense* germplasm resources

图中每条彩色竖线代表一份种质(Each individual is represented by a single color line)。

3 讨 论

本研究所用 10 个微卫星位点多态信息含量 *PIC* 介于 0.66~0.92 之间，均属于高度多态性位点(Botstein et al, 1980)，可见这些位点能够较为充分地诠释钱塘江日本沼虾野生群体的遗传多样性和遗传结构。

7 个群体平均期望杂合度介于 0.83~0.88 之间，比洪泽湖日本沼虾(H_e=0.698~0.804)(Feng et al, 2010)和泰国罗氏沼虾(*M.rosenbergii*)(H_e=0.64~0.73)(Kancee et al, 2007)高，可见钱塘江日本沼虾野生群体具有较高的遗传多样性水平。钱塘江中下游 5 个日本沼虾野生群体的遗传多样性水平(平均 H_e=0.85，平均 I=2.26 和平均 N_e=8.17)要高于上游的歙县和休宁两个群体，即钱塘江中下游水域日本沼虾的遗传多样性水平自上游到下游呈下降趋势，遗传多样性的地理位置差异与日本沼虾适应环境的能力密切相关，遗传多样性越丰富，日本沼虾的适应性和生存能力越强。除了地理位置不同外，日本沼虾的遗传多样性会不会有可能与适应不同海拔环境条件有关呢，这有待进行下一步的研究。从遗传多样性水平来看，我们应该对钱塘江中下游水域的日本沼虾种质资源给予进一步收集分析，以不断丰富钱塘江日本沼虾种质资源的研究、保护和利用工作。

钱塘江中下游日本沼虾群体间平均基因流 N_m=2.77，而上游日本沼虾群体间平均基因流 N_m=2.26，相比之下，上游日本沼虾群体间基因交流的水平要低于中下游水域，这可能是不同水域的水体流量不同所致。歙县和休宁群体所生存的上游水域水体流量相对较小，这就对群体之间的基因交流产生影响，导致基因流 N_m 降低。并且，歙县和休宁日本沼虾群体并非都属干流群体，水体自然流动对两个群体之间的基因交流所起的作用则大大降低；中下游的新安江等 5 个日本沼虾群体则处在干流水域，水体的自然流动对日本沼虾群体间的基因交流影响更为突出。水体的自然流动对日本沼虾的影响还表现在不同水体的注入。歙县和休宁群体、桐庐和新安江群体的遗传多样性参数都呈现出一个规律，即不同的水体注入将会影响群体的遗传多样性水平，歙县群体、新安江群体所处的水域都有新的支流汇入，所以它们相对休宁群体、桐庐群体表现出了较高的遗传多样性水平。而综合不同群体的遗传多样性数据，我们发现桐庐群体的遗传多样性水平为最低，这可能是由于水电大坝影响水体自然流动所致。

处于突变-漂移平衡下的种群，微卫星位点显示杂合过剩与杂合不足的概率应大致相等。种群在进化中经历瓶颈效应后，等位基因数目和杂合度均会降低，其中等位基因丢失比杂合度降低速度快，从而导致杂合过剩。因此，通过分析杂合度是否过剩可以判断种群数量是否下降。杂合过剩作为群体数量下降的瞬态效应，在 SMM 突变模型下并不一定都能观察到，也只有少数微卫星位点完全符合一步的逐步突变模型(Cornuet & Luikart, 1997)。因此，本研究中的微卫星数据使用 IAM 和 TPM 两种突变模型相对比较合适。瓶颈效应分析结果显示，在 IAM 突变模型下，所有位点表现为杂合过剩；在 TPM 突变模型下，各有 8 个位点表现为杂合过剩。因此，微卫星位点变异情况反映了钱塘江日本沼虾群体大部分位点已经杂合过剩，群体数量已经下降。而突变-漂移平衡的两种检验结果显示，在 IAM

突变模型下只有闻堰群体具有显著和极显著杂合过剩位点，而在 TPM 突变模型下钱塘江日本沼虾不具有显著或极显著杂合过剩位点，各群体没有偏离突变-漂移平衡，这一结果又表明，日本沼虾野生群体近期的群体数量没有下降。两种分析方法出现完全不同结论的原因可能与日本沼虾的生物学特性有关：日本沼虾的寿命一般仅 14~18 个月，经过越冬的日本沼虾，一般在次年的 8~10 月份死亡，使得日本沼虾的数量减少，这一自然死亡的现象导致了瓶颈效应分析结果有偏差。因此，本研究认为钱塘江日本沼虾群体在近期没有经历过瓶颈效应，群体数量没有下降。而闻堰群体瓶颈效应产生的原因，尚待进一步的研究。瓶颈效应分析是评估种群发展趋势的一种方法，可为水产动物种质资源保护提供参考意见，对于经历过瓶颈效应的闻堰群体，在其育种和保种过程中须加以重视。

群体间遗传固定指数 F_{ST} 显示，群体间遗传分化指数介于 0.0201 ~ 0.1069 之间，属于中低等程度分化($0.05<F_{ST}<0.15$)(Hartl & Clark, 1997), AMOVA 分析结果也显示了 7 个群体处于中等程度分化水平。地理位置的远近与 F_{ST} 的大小具有相关性，可见对于日本沼虾而言，地理距离对其分化程度有较为重要的影响，这可能与日本沼虾的生活习性相关：日本沼虾游泳能力较弱，只能作短距离的游动，多数时间攀附于水草或其他水中物体上，仅在幼苗时期随水流或者人为携带而被动扩散(Feng et al, 2008)。Hamrick 等认为以异交为主的物种, 90%的遗传变异发生在群体内部(Brown & Clegg, 1989)。本研究的 AMOVA 分析结果表明，仅 6.52%的遗传变异发生在群体间，而 93.48%的遗传变异存在于个体间，与上述结论一致。7 个日本沼虾野生群体的聚类顺序也与实际的地理位置分布较为一致。

413 份参试的日本沼虾样本被分为 2 个理论种群，即歙县和休宁群体为一支，其余为另一支，这与基于遗传距离的 NJ 聚类树顺序一致。可以看出，划分的 2 个种群与地理分布具有相关性。遗传结构分析表明，不同地区的群体遗传结构和种质资源是不同的，钱塘江中下游地区的多样性水平较高的趋势更为明显，这与水流作用带来的基因交流有密切关系。被划分的第一个种群和第二个种群种质资源的群体遗传结构具有明显差异，第一种群的群体遗传结构比较复杂，不同个体的种质资源的遗传结构趋向于二元化，而被划分出来的第二个种群的个体的遗传结构则趋向于一元化。

钱塘江野生日本沼虾的遗传多样性和遗传结构研究结果表明，钱塘江中下游水域日本沼虾的遗传多样性有高于上游的趋势，遗传多样性水平的高低受到了水体自然流动和人类活动的影响。日本沼虾的遗传多样性和遗传结构也与所生存的地理位置具有相关性。

参考文献：

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, **32**: 31-34.

Brooker AL, Benzie JAH, Blair D, Versini JJ. 2000. Population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Australian waters using microsatellite markers [J]. *Mar Biol*, **136**: 149-157.

Brown AHD, Clegg MT. 1989. Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 43-63.

Chand V, de Bruyn M, Mather PB. 2005. Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Mol Ecol Notes*, **5**: 308-310.

Cornuet JM, Luikart G. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data [J]. *Genetics*, **144**: 2001-2014.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. *Mol Ecol*, **14**: 2611-2620.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evol Bioinform Online*, **1**: 47-50.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies [J]. *Genetics*, **164**: 1567-1587.

Feng JB, Li JL, Cheng X. 2008. Research progress on germplasm resource exploitation and protection of Macrobrachium nipponense [J]. *J Shanghai Fish Univ,* **15**(3): 371-376. (in Chinese) [冯建彬，李家乐，程熙. 2008. 日本沼虾种质资源挖掘和保护研究进展. 上海水产大学学报, **15**(3): 371-376.]

Feng JB, Ma KY, Li JL, Hua XM, Ding HY. 2010. Isolation and genetic diversity analysis of microsatellite DNA in *Macrobrachium nipponense* [J]. *J Fish Chn*, **34**(5): 688-695. (in Chinese) [冯建彬，马克异，李家乐，华雪铭，丁怀宇. 2010. 日本沼虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析. 水产学报, **34**(5): 688-695.]

Feng JB, Sun YN, Cheng X, Li JL. 2008. Sequence analysis of mitochondrial COI gene of *Macrobrachium nipponense* from the five largest freshwater lakes in China [J]. *J Fish Chn,* **32**(4): 517-525. (in Chinese) [冯建彬，孙悦娜，程熙，李家乐. 2008. 我国五大湖青虾线粒体 COI 基因片段序列比较研究. 水产学报, **32**(4): 517-525.]

Feng JB, Wu CL, Ding HY, Hua XM, Li YS, Li JL. 2010. Microsatellite analysis of genetic diversity in 9 wild stocks of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in Hongze Lake [J]. *J Fish Sci Chn*, **17**(2):

1-10. (in Chinese) [冯建彬, 吴春林, 丁怀宇, 华雪铭, 李应森, 李家乐. 洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体遗传多样性微卫星分析. 中国水产科学, **17**(2): 1-10.]

Fu HT, Qiao H, Li FJ, Wu Y, Gong YS, Jiang SF, Xiong YW, Wang N. 2010. Genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* on a regional scale in the Yangtze River [J]. *J Fish Chn*, **34**(2): 204-212. (in Chinese) [傅洪拓, 乔慧, 李法君, 吴滟, 龚永生, 蒋速飞, 熊贻伟, 王宁. 2010. 长江不同江段青虾的遗传多样性. 水产学报, **34**(2): 204-212.]

Hartl DL, Clark AG.. 1997. Principles of Population Genetics [M]. 3nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 74-110.

Jiang SF, Fu HT, Xiong YW, Wu Y, Gong YS, He XL. 2006. Genetic diversity of four geographical populations of *Macrobrachium nipponense* revealed by RAPD analysis [J]. *J Yangtze Univ*: *Natural Science Edition*, **3**(2): 179-182. (in Chinese)[蒋速飞 傅洪拓 熊贻伟 吴滟 龚永生 何新龙. 2006. 日本沼虾 4 个地理群体遗传变异的 RAPD 分析. 长江大学学报：自然科学版, **3**(2): 179-182.]

Kancee C, Supawadee P, Uthairat N, Wongpathom K. 2007. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand [J]. *Aquaculture*, **271**: 121-129.

Li JL, Nie SZ, Feng JB, He W, Fan YP, Cheng X. 2005. The comparison of growth and culture performance in cage for five stocks of Oriental river prawn from the midstream and downstream of Yangtze River [J]. *J Shanghai Fish Univ,* **14**(3): 258-262. (in Chinese) [李家乐, 聂式忠, 冯建彬, 何 为,范益平, 程熙. 2005. 长江中下游五个青虾群体网箱生长和养殖性能比较. 上海水产大学学报, **14**(3): 258-262.]

Maruyama T, Fuerst PA. 1985. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck [J]. *Genetics*, **111**: 675-689.

Nei M, Jajima F, Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. *J Mol Evol*, **19**: 153-170.

Rousset F. 2008. GENEPOP'007: a complete e-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux [J]. *Mol Ecol Resour*, **8**:103-106.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sun YN, Feng JB, Li JL, Nie SZ. 2007. Sequence analysis and molecular phylogeny of mitochondrial 16S rRNA gene fragments in three populations of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Chn J Zool*, **42**(1): 59-66. (in Chinese) [孙悦娜, 冯建彬, 李家乐, 聂式忠. 2007. 日本沼虾三群体线粒体 16S rRNA 基因片段序列的差异与系统进化. 动物学杂志, **42**(1): 59-66.]

Wu Y, Fu HT, Li JL, Gong YS, Li MS. 2008. Research on genetic diversity of Macrobrachium nipponense in Taihu Lake [J]. *J Shanghai FishUniv*, **17**(5): 620-624. (in Chinese) [吴滟, 傅洪拓, 李家乐, 龚永生, 李明爽. 2008. 太湖日本沼虾的遗传多样性分析. 上海水产大学学报, **17**(5): 620-624.]

Yang P, Zhang H, Chen LQ, Ye JY, Yu N, Gu ZM, Song DX. 2007. Genetic structure of the Oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) from the Yangtze and Lancang Rivers, inferred from COI gene sequence [J]. *Zool Res*, **28**(2): 113-118. (in Chinese) [杨频, 张浩, 陈立侨, 叶金云, 禹娜, 顾志敏, 宋大祥. 2007. 利用 COI 基因序列分析长江与澜沧江水系日本沼虾群体的遗传结构. 动物学研究, **28**(2): 113-118.]

Zhu YA, Shan H, Wang Q, Zhou GQ. 2008. Genetic diversity of three geographical populations of *Macrobrachium nipponense* revealed by RAPD analysis [J]. *J Aquac*, **29**(1): 5-7. (in Chinese) [朱银安, 单红, 王庆, 周国勤. 2008. 长江、高邮湖、太湖日本沼虾遗传多样性的 RAPD 分析. 水产养殖, **29**(1): 5-7.]